

(11) Número de Publicação: **PT 1225870 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 9/00 (2006.01) **A61K 38/19** (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2000.10.05**

(30) Prioridade(s): **1999.10.05 US 412681**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.07.31**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.12.27**
012/2007

(73) Titular(es):

TVAX BIOMEDICAL, LLC

500 WEST 112TH STREET KANSAS, MO 64114
US

(72) Inventor(es):

GARY W. WOOD **US**

(74) Mandatário:

PEDRO GIL DA SILVA PELAYO DE SOUSA HENRIQUES
R DE SÁ DA BANDEIRA 706 2 ESQ 4000-432 PORTO **PT**

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO E MÉTODO DE IMUNOTERAPIA ANTIGÉNICA DO CANCRO**

(57) Resumo:

RESUMO

"COMPOSIÇÃO E MÉTODO DE IMUNOTERAPIA ANTIGÉNICA DO CANCRO"

Método de imunoterapia do cancro e composição para o tratamento do cancro num paciente compreendendo a vacinação do paciente com uma vacina compreendendo o próprio tumor maligno do paciente e um adjuvante imunológico, a remoção de linfócitos T sensibilizados do sangue periférico do paciente, a estimulação dos linfócitos T sensibilizados para os diferenciar em *in vitro* em linfócitos efectores, a estimulação dos linfócitos T efectores para proliferarem *in vitro*, e a infusão dos linfócitos T efectores novamente no paciente.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÃO E MÉTODO DE IMUNOTERAPIA ANTIGÉNICA DO CANCRO"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A. O SISTEMA IMUNITÁRIO E O CANCRO

[0001] O sistema imunitário dos mamíferos utiliza dois mecanismos adaptativos gerais para proteger o corpo de patógenos ambientais. Um é a resposta inflamatória não específica (ou inata). O outro é a resposta imunitária específica ou adquirida (ou adaptativa). As respostas inatas são fundamentalmente as mesmas para cada agressão. Pelo contrário, as respostas adquiridas são personalizadas para o patógeno.

[0002] O sistema imunitário reconhece e responde às diferenças estruturais entre proteínas próprias e não-próprias. As proteínas que o sistema imunitário reconhece como não-próprias são denominadas "antigénios". Os patógenos expressam um grande número de antigénios altamente complexos. A imunidade adquirida tem "memória" específica para estruturas antigénicas e a exposição repetida ao mesmo antigénio aumenta a resposta, o que aumenta o nível de protecção induzida contra esse patógeno particular.

[0003] A imunidade adquirida é mediada por células imunológicas especializadas denominadas linfócitos B e T. Os linfócitos B produzem e medeiam as suas funções através da acção de anticorpos. As respostas imunitárias dependentes dos linfócitos B são referidas como "imunidade humoral" uma vez que os anticorpos são detectados nos fluidos corporais. As respostas imunitárias dependentes dos linfó-

citó T são referidas como "imunidade por mediação celular" uma vez que as actividades efectoras são directamente mediadas pelas acções locais dos linfócitos T efectores. As acções locais dos linfócitos T efectores são amplificadas através de interacções sinérgicas entre os linfócitos T e as células efectoras secundárias, tais como macrófagos activados. O resultado é que o patógeno é morto e, portanto, impedido de provocar doença.

[0004] A imunidade ao cancro é mediada exclusivamente por linfócitos T, o que significa que envolve a imunidade por mediação celular adquirida e não implica os linfócitos B ou os anticorpos. Uma resposta imunitária adquirida activada mata as células cancerosas e rejeita o cancro.

[0005] As intervenções médicas tiram frequentemente partido do facto de as respostas imunitárias adquiridas poderem ser artificialmente manipuladas. A exposição de indivíduos a um patógeno enfraquecido induz uma imunidade adquirida sem provocar doença e protege o indivíduo contra a posterior exposição ao mesmo patógeno. O processo geral de induzir artificialmente respostas imunitárias protectoras designa-se por vacinação. A imunidade protectora face a certos agentes patogénos pode ser transferida de um indivíduo para outro, utilizando linfócitos T. Apesar da imunidade ao cancro poder ser transferida entre indivíduos utilizando linfócitos T, presentemente não existem intervenções médicas aceites que utilizem a transferência de linfócitos T entre indivíduos.

[0006] As vacinas são principalmente úteis na prevenção de doenças. A vacinação tem sido utilizada para induzir a protecção contra uma grande variedade de patógenos ambientais, em particular vírus. O sucesso dramático conseguido com as vacinas levou à procura de aplicações terapêuticas.

A procura de uma vacina terapêutica do SIDA é um exemplo bem conhecido. Infelizmente, a manipulação do sistema imunitários para tratar uma doença preexistente tem-se provado ser muito mais difícil do que a manipulação do sistema imunitário para protecção. O único sucesso bem documentado contra uma doença humana foi conseguido com a raiva. Múltiplas vacinas podem evitar que a raiva se desenvolva após exposição ao vírus. Aplicou-se o mesmo princípio geral ao tratamento do cancro. O pensamento foi o de que, uma vez que, ao contrário dos vírus, os cancros são de crescimento relativamente lento, deveria ser possível utilizar vacinas para abrandar ou impedir o crescimento ou a propagação adicionais. Contudo, apenas se conseguiu um sucesso muito limitado com as vacinas contra o cancro.

[0007] Não é intuitivo que as malignidades sejam susceptíveis à manipulação imunitária. As células malignas são células normais geneticamente alteradas e não patógenos estranhos. O sistema imunitário deve ser capaz de reconhecer as células malignas como não-próprias e deve ser possível manipular o sistema imunitário para rejeitar as células cancerosas que possam ter-se disseminado para locais remotos do corpo. Embora as células malignas não sejam realmente patógenos estranhos, existe o consenso alargado de que as células malignas podem ser reconhecidas como não-próprias. Os antígenos do cancro são criados a partir de alterações genéticas pelas quais passam as células cancerosas durante a transformação maligna e a progressão. *Vide* Srivastava, *Do Human Cancers Express Shared Protective Antigens? Or the Necessity of Remembrance of Things Past*, *Semin. Immunol.* 8:295-302 (1996). No entanto, o grau até ao qual se pode manipular o sistema imunitário dos pacientes com cancros progressivos é extremamente con-

troverso. Vide Ellem et al., *The Labyrinthine Ways of Cancer Immunotherapy - T Cell, Tumor Cell Encounter: "How Do I Lose The? Let Me Count The Ways."* Adv. Canc. Res. 75:203-249 (1998). Isto é principalmente devido ao facto de, à semelhança das tentativas de utilizar o sistema imunitário para tratar uma doença infecciosa, as tentativas para manipular o sistema imunitário para o benefício terapêutico dos pacientes cancerosos terem sido largamente mal sucedidas. A controvérsia em torno da potencial susceptibilidade do cancro humano à manipulação imunitária também provém do facto de generalizadamente se crer que as malignidades humanas são fracamente imunogénicas. Consequentemente, houve muito poucas tentativas sistemáticas para determinar a imunogenicidade relativa dos cancros humanos.

[0008] Como determinam os investigadores se uma substância é antigénica ou que foi induzida uma resposta imunitária adquirida num indivíduo que havia sido exposto a um antigénio? Para a imunidade humoral, existe uma grande quantidade de ensaios *in vitro* para medir um aumento dos níveis de anticorpos no soro. Contudo, é infinitamente mais difícil determinar se foi induzida uma resposta imunitária por mediação celular. Ao longo dos anos, os ensaios de protecção *in vivo* provaram ser os indicadores mais seguros quando o antigénio é um patógeno. Os ensaios de protecção funcionam bem quando o antigénio em questão provoca uma doença e quando os estudos se realizam em modelos experimentais. Um indivíduo é vacinado com o antigénio em questão e posteriormente provocado com quantidades crescentes do agente patogénico. Assim, no caso do cancro, expõem-se ratos a uma vacina contra o cancro, injectando-os posteriormente com células cancerosas vivas. Se as células cancerosas deixarem de crescer, então o animal está

imune e pode inferir-se que foi induzida uma resposta imunitária. Esta abordagem também pode ser utilizada para quantificar e determinar a especificidade da resposta.

[0009] As experiências de protecção não podem ser utilizadas para medir as respostas imunitárias anticancerosas em seres humanos, porque seria contrário à ética injectar pacientes com células causadoras de cancro. Uma vez que os antigénios do cancro permanecem por definir e que as respostas imunitárias por mediação celular contra o cancro envolvem uma interacção complexa e mal entendida entre várias subpopulações de linfócitos T, não existe um modo simples e fiável de quantificar tais respostas *in vitro*. Em vez disso, foram desenvolvidos há muito tempo os testes cutâneos de hipersensibilidade de tipo retardado ("DTH"), como um ensaio *in vivo* alternativo para a imunidade por mediação celular. A reacção de DTH tira partido do facto de um animal ou humano imunes desenvolverem uma reacção de imunidade celular adquirida que se caracteriza pela vermelhidão e inchaço que ocorrem dentro das 24 a 48 horas que se seguem à injeção local do antigénio.

[0010] Embora existam ensaios *in vitro* que podem ser susceptíveis de ser rotineiramente utilizados no futuro, a reacção de DTH é o único método que tem sido utilizado até à data para medir as respostas imunitárias aos antigénios do cancro em seres humanos. *Vide* Berd et al., *Treatment of Metastatic Melanoma with Autologous Tumor Cell Vaccine: Clinical and Immunologic Results in 64 Patients*, J. Clin. Oncol. 8:1858-1865 (1990); Hoover & Hanna, *Active Immunotherapy in Colorectal Cancer*, Semin. Surg. Oncol. 5:436-440 (1989); Lehner et al., *Postoperative Active Specific Immunization in Curatively Resected Colorectal Cancer Patients with a Virus-Modified Autologous Tumor Cell*

Vaccine, Cancer Immunol. Immunother. 32:173-178 (1990). As razões para isto são quadruplas. Primeiro, apesar de as células malignas serem imunogénicas, ainda não foi identificado, caracterizado e purificado, a partir de tais células, qualquer antígeno do cancro humano específico. Segundo, as respostas de DTH, assim como a imunidade tumoral, são mediadas localmente por uma combinação de linfócitos Th1 activados e linfócitos T de CD8 tipo Th1 não-citotóxicos. Vide Cher & Mosmann, *Two types of Murine Helper T Cell Clone. II. Delayed-Type Hypersensitivity Is Mediated by TH1 Clones*, J. Immunol. 138:3688-3694 (1987); Modey et al., *CD8 Cells Play a Critical Role in Delayed Type Hypersensitivity to Intact Cryptococcus Neoformans*, J. Immunol. 152:3970-3979 (1994). Terceiro, tem sido demonstrado que a imunidade tumoral se correlaciona com as respostas de DTH aos antígenos do cancro em modelos animais. Vide Puccetti et al., *Use of a Skin Test Assay to Determine Tumor-Specific CD8+ T Cell Reactivity*, Europ. J. Immunol. 24:1446-1452 (1994); Barth et al., *Interferon γ and Tumor Necrosis Factor Have a Role in Tumor Regressions Mediated by Murine CD8⁺ Tumor-Infiltrating Lymphocytes*, J. Exp. Med. 173:647-658 (1991). Finalmente, os ensaios *in vitro* actualmente disponíveis para a função de linfócitos T específicos de um antígeno nos humanos são tecnicamente difíceis e pouco fiáveis.

B. IMUNOTERAPIA DO CANCRO: ESTRATÉGIAS DE RESPOSTA IMUNITÁRIA INATA

[0011] Foram utilizadas duas aproximações gerais nas tentativas de estimular o sistema imunitário a parar a progressão do cancro. A primeira abordagem foi a de esti-

mular respostas imunitárias inatas. Geralmente, os pacientes cancerosos são expostos a um biomodulador, tal como o *Bacillus Calmette Guérin* ("BCG"), a interleuquina-2 ("IL-2"), o factor de necrose tumoral ("TNF") ou o interferon ("IFN"), na esperança de que as células imunitárias não especificamente activadas inibam o crescimento adicional do cancro. Infelizmente, com poucas excepções, estes agentes exibem uma actividade anticancerosa modesta e, à semelhança de outros agentes quimioterapêuticos, são altamente tóxicos para concentrações eficazes.

[0012] Uma variação neste tema da imunoterapia inata que também foi extensivamente avaliada consistiu em tirar partido do facto de os biomoduladores aumentarem a actividade anticancerosa das células imunitárias (macrófagos, células exterminadoras naturais ("NK") e linfócitos) *in vitro*. A exposição de linfócitos a altas concentrações de agentes tais como a IL-2 produz células exterminadoras activadas por linfoquina ("LAK") que fazem parte do sistema imunitário inato. Apesar das células LAK serem mais capazes de exterminar células cancerosas do que células normais, não exibem especificidade para os antígenos do cancro. O princípio para os estudos terapêuticos que utilizam as células LAK foi o de que, se se conseguisse aumentar a capacidade exterminadora dos linfócitos, esses linfócitos potenciados seriam capazes de destruir *in vivo* os cancros em progressão.

[0013] Steven Rosenberg do *National Cancer Institute* realizou o primeiro teste humano de células LAK autólogas em 1985. As células LAK eram geradas a partir de leucócitos de sangue periférico ("PBL") de pacientes com tumores. Após a cultura das células a concentrações elevadas de IL-2, as células LAK foram então injectadas de novo no pa-

ciente canceroso. Os pacientes também foram expostos a altas concentrações (≥ 18 MUI/paciente/dia) de IL-2 após terem recebido as células LAK. Vide Rosenberg, patente U.S. n.º 4 690 915. Regressões tumorais significativas foram observadas principalmente em pacientes com melanomas e cancro nas células renais.

[0014] Os estudos subsequentes com utilização de células LAK centraram-se nos melanomas e nos cancros renais. Em oito estudos diferentes, 190 pacientes com melanoma apresentaram uma taxa de resposta global (completa e parcial) de 16%. Para o cancro das células renais, 198 pacientes de 8 estudos diferentes apresentaram uma taxa de resposta global de 22%. Vide Chang, *Current Status of Adoptive Immunotherapy of Cancer*, Crit. Rev. Oncol. Hem. 22:213-228 (1996). No entanto, acredita-se geralmente que os efeitos terapêuticos deveram-se não às células LAK adoptivamente transferidas, mas sim às altas concentrações (≥ 18 MUI/paciente/dia) de IL-2 que os pacientes receberam depois da infusão dos linfócitos activados. Os estudos subsequentes em modelos animais foram incapazes de documentar uma significativa actividade antitumoral *in vivo* das células LAK propriamente ditas.

[0015] Uma variação do mesmo tema da imunoterapia inata, que também foi defendida por Stephen Rosenberg, é a transferência adoptiva dos linfócitos infiltradores de tumores ("TIL"). A imunoterapia de TIL envolve a utilização de altas concentrações (≥ 1000 UI/ml) de IL-2 para estimular células mononucleares originalmente isoladas do infiltrado inflamatório que se encontra à volta de tumores sólidos. O princípio é o de que os TILs podem ser enriquecidos para linfócitos T citolíticos específicos de tumores e para células NK. Os investigadores teorizaram que o infiltrado linfóide dentro de um tumor representa

filtrado linfóide dentro de um tumor representa uma população seleccionada de células imunitárias que migraram preferencialmente para o tumor. Ao contrário das células LAK, mas tal como os linfócitos T activados, as células TIL são por vezes capazes de lisar células cancerosas autólogas de um modo altamente específico e restringido pelas moléculas do complexo maior de histocompatibilidade ("MHC") de classe I. Os investigadores reivindicaram que a imunoterapia de TIL é 50-100 vezes mais eficaz do que a imunoterapia de LAK. Vide Rosenberg, patente U.S. n.º 5 126 132; Rosenberg et al., *Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma*, New Engl. J. Med. 319:1676-80 (1988). À semelhança dos estudos das células LAK, foi difícil separar os efeitos *in vivo* dos TIL dos efeitos anticancerosos da alta dosagem de IL-2.

[0016] Outra variação nesta abordagem geral para gerar células efectoras não específicas para a transferência adoptiva para pacientes é a de estimular os PBL de pacientes cancerosos com anti-CD3, um estímulo de receptor anti-génico não específico. Vide Ochoa et al., patente U.S. n.º 5 443 983; Ochoa et al., patente U.S. n.º 5 725 855; Babbitt et al., patente U.S. n.º 5 766 920; Terman, patente U.S. n.º 5 728 388. A ideia foi a de que os pacientes deviam ter em circulação precursores de linfócitos T específicos de antígenos do cancro cujo potencial de combate contra o cancro poderia ser aumentado pela sua estimulação com anti-CD3 em cultura. Tais linfócitos T activados não especificamente também não possuem efeitos antitumorais significativos *in vivo*, apesar do facto de terem sido gerados a partir do sangue de pacientes cancerosos.

C. IMUNOTERAPIA DO CANCRO: ESTRATÉGIAS DE RESPOSTA IMUNITÁRIA ADQUIRIDA

[0017] A segunda abordagem geral imunoterapêutica difere das estratégias não específicas prévias, principalmente no facto de ser concebida para induzir respostas imunitárias adquiridas, e depois aumentá-las, contra as próprias células cancerosas do paciente. A abordagem baseia-se no facto bem documentado de que o sistema imunitário normalmente falha no reconhecimento e na resposta a malignidades progressivas, mas que é possível usar a vacinação para induzir o paciente canceroso a responder imunologicamente a moléculas expressas pelas células malignas mas não pelas células normais. O princípio básico é o de que o cancro poderia ser tratado com sucesso se fosse possível induzir uma resposta imunitária adquirida suficientemente poderosa contra os antigénios associados à célula cancerosa.

[0018] As estratégias mais bem sucedidas que foram testadas nesta categoria combinam o facto de a vacinação induzir uma resposta imunitária protectora e de a imunidade protectora poder ser transferida com linfócitos T activados. A parte da vacinação nesta estratégia tem sido frequentemente denominada imunoterapia específica activa ("ASI"). Utiliza-se o termo "activa" porque a vacinação induz activamente as respostas imunitárias. Utiliza-se o termo "específica" porque a estratégia é concebida para induzir uma resposta imunitária contra os antigénios que são expressos pelas próprias células cancerosas do paciente. A parte da transferência das células, na estratégia, é geralmente conhecida por imunoterapia celular adoptiva ("ACI"). Utiliza-se o termo "adoptivo" porque a estratégia envolve a transferência de células efectoras imunitárias

de um local para outro. Utiliza-se o termo "celular" porque a estratégia implica a transferência de células imunitárias.

1. Imunoterapia Específica Activa ("ASI")

[0019] O conceito de ASI é bem conhecido na técnica, e realizaram-se muitos testes clínicos de ASI utilizando uma grande variedade de fontes para o antigénio do cancro. Existem duas razões básicas para seguir esta abordagem. Apesar da controvérsia alargada acerca da imunogenicidade de cancros humanos particulares, as vacinas induzem efectivamente a imunidade cancerígena. Não existe razão teórica para que uma vacina poderosa não possa ser terapêutica contra o cancro. Se uma vacina pode produzir imunidade protectora que seja suficientemente poderosa para ser terapêutica, deveria ser relativamente simples adicioná-la ao arsenal de tratamento do cancro.

[0020] Estão a ser presentemente exploradas várias estratégias de vacinação gerais. A mais simples delas é a de vacinar pacientes com as suas próprias células cancerosas. A abordagem com células inteiras foi testada quanto à eficácia terapêutica em vários estudos em humanos. Um desses estudos envolveu o tratamento de pacientes com melanoma vacinando-os com as suas próprias células cancerosas quimicamente alteradas e BCG. Vide Berd, patente U.S. n.º 5 290 551; Berd et al., *Treatment of Metastatic Melanoma with Autologous Tumor Cell Vaccine: Clinical and Immunologic Results in 64 Patients*, J. Clin. Oncol. 8:1858-1865 (1990). Um segundo estudo envolveu o tratamento de pacientes com cancro do cólon vacinando-os com as suas próprias células cancerosas e BCG. Vide Hanna, Jr. et al., patente

U.S. n.º 5 484 596; Vermorken et al., *Active Specific Immunotherapy for Stage II and Stage III Human Colon Cancer: a Randomized Trial*, *Lancet* 353:345-350 (1999).

[0021] Dois factos gerais tornaram-se claros acerca da ASI. O primeiro é que a fonte do antigénio do cancro é crítica para o sucesso. Actualmente, as células viáveis, intactas do próprio cancro do paciente fornecem a melhor fonte. O segundo é que o antigénio do cancro tem de ser combinado com um adjuvante imunológico para aumentar a potência da vacina. Tem vindo a ser utilizado o BCG como o adjuvante imunológico para a maioria dos testes clínicos de ASI em humanos. No entanto, o BCG, tem várias desvantagens como adjuvante, tais como a sua toxicidade relativamente elevada e a sua potência relativamente baixa. As propostas mais recentes para aumentar a potência de vacinas de células cancerosas autólogas envolveram a alteração genética das células cancerosas para as tornar mais imunogénicas. Uma abordagem bem sucedida envolveu a inserção do gene para a citoquina, o factor estimulante das colónias de macrófagos e granulócitos ("GM-CSF") em células tumorais. Vide Bonnen et al., patente U.S. n.º 5 679 356; Dranoff et al., patente U.S. n.º 5 637 483; Dranoff et al., *Vaccination with Irradiated Tumor Cells Engineered to Secrete Murine GM-CSF Stimulates Potent, Specific, Long-Lasting Anti-Tumor Immunity*, *PNAS (USA)* 90:3539-3543 (1993). No entanto, observações muito recentes sugerem que misturando simplesmente GM-CSF solúvel com células cancerosas autólogas serve para o mesmo fim. Isto é, o GM-CSF, por si só, é um adjuvante muito eficaz.

[0022] Em resumo, as estratégias de vacinação mais potentes actualmente disponíveis induzirão respostas imunitárias na maioria dos pacientes contra o seu próprio

cancro, e a vacinação múltipla pode atrasar a progressão maligna. Contudo, a ASI por si só não produz curas nem em modelos humanos, nem em animais.

2. Imunoterapia Celular Adoptiva ("ACI")

[0023] O conceito de ACI também é bem conhecido na técnica. As primeiras experiências documentadas envolvendo a transferência celular de imunidade ocorreram em 1942 quando os investigadores descobriram que a DTH para compostos químicos simples podia ser transferida de dadores (imunes) sensibilizados para receptores (não imunes) ingênuos com células de exsudatos peritoneais. Vide Landsteiner et al., *Experiments on Transfer of Cutaneous Sensitivity to Simple Compounds*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 49:688-690 (1942). Isto é importante para a terapia do cancro, uma vez que a vacinação dos pacientes com as suas próprias células cancerosas e um adjuvante imunológico induzirá fortes respostas de DHT. Vide Hoover & Hanna, *Active Immunotherapy in Colorectal Cancer*, Semin. Surg. Oncol. 5:436-440 (1989); Lehner et al., *Postoperative Active Specific Immunization in Curatively Resected Colorectal Cancer Patients with a Virus-Modified Autologous Tumor Cell Vaccine*, Cancer Immunol. Immunother. 32:173-178 (1990). Em 1954, inventou-se a expressão "imunoterapia adoptiva" para descrever a aquisição de imunidade num sujeito normal em resultado da transferência de células linfóides imunologicamente activadas. Vide Billingham et al., *Quantitative Studies on Tissue Transplantation*, Proc. R. Soc. Exp. Biol. 143 :58-80 (1954). A transferência adoptiva de células de gânglios linfáticos ("LN") nos ratos foi reportada um ano mais tarde. Vide Michison, *Studies on the*

Immunological Response to Foreign Tumor Transplants on the Mouse, J. Exp. Med. 102:157-177 (1955).

[0024] A transferência adoptiva de imunidade adquirida é extremamente importante porque se trata de uma técnica que permitiu aos imunologistas dissecar a base celular do sistema imunitário. Não é intuitivo que a transferência adoptiva de células imunitárias providencie uma ferramenta imunoterapêutica útil contra a doença. De facto, apesar de a transferência adoptiva de linfócitos T imunitários transferir protecção, do mesmo modo que a vacinação induz protecção, os linfócitos transferidos adoptivamente proporcionam por si sós pouco ou nenhum benefício terapêutico. Não rejeitarão cancros em progressão. Por conseguinte, apesar de a ACI ser bem conhecida na técnica, não é óbvio que a mesma possa fornecer a base para uma estratégia imunoterapêutica potente contra o cancro.

3. Imunoterapia por Antígeno do Cancro ("CAI")

[0025] A questão que os investigadores colocaram de seguida foi se a ASI e a ACI, ambas protectoras, poderiam ser reunidas numa forma que produzisse um produto combinado simultaneamente protector e terapêutico. No entanto, a estratégia imunoterapêutica tem de ser capaz de rejeitar a doença preexistente. Os humanos já têm cancro quando começam as tentativas para manipular o sistema imunitário. De facto, mesmo no diagnóstico, normalmente eles têm uma doença mais avançada do que as cobaias experimentais que são alvo dos testes de imunoterapia.

[0026] O princípio para a combinação da ASI com a ACi é o de que apesar de nem a vacinação, nem a transferência adoptiva de leucócitos activados dos pacientes cancerosos,

incapacidade da vacinação para produzir um número elevado de linfócitos T efectores específicos de antigénios do cancro e que a deficiência poderia ser resolvida activando adicionalmente os linfócitos T ex vivo em laboratório e posteriormente transferindo adoptivamente as células activadas para os portadores de tumores. Assim, a combinação da ASI e da ACI produziu uma estratégia terapêutica eficaz.

[0028] Estudos posteriores demonstraram que os linfócitos T imunitários específicos de antigénios do cancro podiam ser estimulados para se diferenciarem em linfócitos T efectores utilizando estimulantes de receptores antigénicos não específicos, tal como um anti-CD3. A etapa crítica nestes estudos é a de que os linfócitos tinham de ser provocados com o antigénio antes da exposição ao anti-CD3. *Vide* Yoshizawa et al., *Specific Adoptive Immunotherapy Mediated by Tumor-Draining Lymph Node Cells Sequentially Activated with Anti-CD3 and IL-2*, J. Immunol. 147:729-737 (1991); Saxton et al., *Adoptive Transfer of Anti-CD3 Activated CD4+ T Cells Plus Cyclophosphamide and Liposome Encapsulated Interleukin 2 Cure Murine MC-38 and 3LL Tumors and Establish Tumor Specific Immunity*, Blood 89:2529-2536 (1997); Shu et al., *Stimulation of Tumor-Draining Lymph Node Cells with Superantigenic Staphylococcal Toxins Leads to the Generation of Tumor-Specific Effector T cells*, J. Immunol. 152:1277-88 (1994); Baldwin et al., *Ex Vivo Expansion of Tumor Draining Lymph Node Cells Using Compounds which Activate Intracellular Signal Transduction*, J. Neuro. Oncol. 32:19-28 (1997). Uma grande variedade de cancros experimentais mostrou ser susceptível a estas estratégias.

[0029] A combinação da vacinação com antigénios do

cancro com a transferência adoptiva de linfócitos T activados é conhecida por imunoterapia por antigénios do cancro ("CAI"). Esta estratégia combinatória deve ser distinguida das outras formas da ASI e da ACI, em particular das que não envolvem directamente a indução de uma resposta imunitária adquirida contra as próprias células cancerosas do paciente.

[0030] Chang e os seus colegas foram os primeiros a reportar a aplicação de uma forma de CAI em humanos. Vacinaram, com células cancerosas autólogas irradiadas e BCG, pacientes com melanoma e com cancro das células renais. Os linfócitos foram então obtidos a partir de LNs drenando os locais de vacinação e foram estimulados *in vitro* com células cancerosas autólogas e uma dose baixa de IL-2 e injectados nos pacientes com administração intravenosa concomitante de uma baixa dose de IL-2. Vide Chang et al., *Clinical Observations on Adoptive Immunotherapy With Vaccine-Primed Lymphocytes Secondarily Sensitized with Tumor In Vitro*, Canc. Res. 53:1043-1050 (1993). Não se observaram resultados clinicamente significativos.

[0031] Holladay e os seus colegas realizaram um estudo semelhante com pacientes com cancro cerebral avançado. Os pacientes foram vacinados com as suas próprias células cancerosas e BCG. Os linfócitos T de sangue periférico foram estimulados com células tumorais autólogas e uma baixa dose de IL-2 *in vitro* e foram reintroduzidos nos pacientes. Vide Holladay et al., *Autologous Tumor Cell Vaccination Combined With Adoptive Cellular Immunotherapy in Patients with Grade III/IV Astrocytoma*, J. Neuro-Oncol. 27:179-189 (1996). De novo, não se observaram resultados clinicamente significativos.

[0032] Mais recentemente, o grupo de Chang substituiu o

anti-CD3 por células tumorais, enquanto estímulo para os linfócitos T *in vitro*. Vide Chang et al., *Adoptive Immunotherapy with Vaccine Primed Lymph Node Cells Secondarily Activated with Anti-CD3 and Interleukin-2*, J. Clin. Oncol. 15:79-807 (1997). Os linfócitos foram então obtidos a partir de LNs drenando os locais de vacinação e foram estimulados *in vitro* com anti-CD3 e uma dose baixa de IL-2 e injectados nos pacientes com administração intravenosa concomitante de IL-2. Alguns dos cancros tratados regrediram, mas a sobrevivência dos pacientes não foi significativamente prolongada.

[0033] Um outro grupo de investigadores estudou a exequibilidade, toxicidade e potenciais benefícios terapêuticos de outra forma de CAI em pacientes com tumores cerebrais malignos. Vide Plautz et al., *Systematic T Cell Adoptive Immunotherapy of Malignant Gliomas*. J. Neurosurg. 89:42-51 (1988). Os linfócitos foram obtidos a partir de LNs drenando os locais de vacinação e foram estimulados *in vitro* com enterotoxina estafilocócica A, anti-CD3 e IL-2 e injectados nos pacientes com administração intravenosa concomitante de IL-2. Mais uma vez, não se obtiveram resultados clinicamente significativos.

[0034] Face à considerável variedade de estratégias de tratamento imunológico do cancro, deve resultar claro que não existe intuitivamente uma estratégia óbvia de CAI. Tão-pouco existe uma estratégia que se tenha estabelecido por si própria como o melhor tratamento imunológico para o cancro humano. Não existe uma abordagem imunoterapêutica aprovada pela FDA para o tratamento do cancro. Mesmo entre os imunoterapeutas, há uma crença alargada de que só uns poucos melanomas e cancros das células renais expressam alguma imunogenicidade modesta e que as malignidades huma-

nas, que não o melanoma e o cancro das células renais, não são imunogénicas e, por conseguinte, não são susceptíveis à imunoterapia. Consequentemente, poucos dos estudos clínicos que envolvem imunoterapia implicaram o tratamento de cancros humanos diferentes do melanoma e do cancro renal, que são cancros relativamente pouco comuns. Há também uma crença geral de que, mesmo que os cancros humanos sejam imunogénicos, a tolerância específica ao antigénio e a supressão imunitária impediriam a geração de respostas imunitárias produtivas. *Vide* Ellem et al., *The Labyrinthine Ways of Cancer Immunotherapy - T Cell, Tumor Cell Encounter: "How Do I Lose The? Let Me Count the Ways"*, Adv. Canc. Res. 75:203-249 (1998).

[0035] O sucesso considerável alcançado com a utilização da CAI em modelos pré-clínicos prediz que esta deveria ser pelo menos moderadamente bem sucedida enquanto tratamento do cancro humano. No entanto, as descobertas clínicas obtidas até à data em testes clínicos de fase I/II em humanos não suportam tal reivindicação. Apesar de a disparidade poder ser atribuível a diferenças imunológicas fundamentais entre as malignidades humanas e as experimentais ou ao facto de não ser tecnicamente possível implementar a CAI nos humanos, tal não é provavelmente a explicação. É mais provável que a disparidade não seja devida a falhas técnicas ou conceptuais na tradução da CAI dos animais para os humanos, mas sim a expectativas inadequadas. Não existiu diferença substancial nas estratégias de vacinação, nem nos efeitos da vacinação nos humanos e nas cobaias animais. Quer os humanos, quer as cobaias animais foram vacinados com sucesso com células cancerosas inteiras e com um adjuvante imunológico para induzir uma resposta imunitária contra as suas próprias células malig-

nas. Os linfócitos T autólogos específicos de antígeno de cancro foram obtidos de forma bem sucedida a partir do tecido linfóide e esses linfócitos T foram activados com sucesso *in vitro* nas cobaias animais e em humanos. Em ambos os casos, esses linfócitos T demonstraram capacidade para destruir o tumor *in vitro*. Foi possível injectar os linfócitos T activados na corrente sanguínea das cobaias animais e de indivíduos humanos portadores de cancro. Os linfócitos T injectados demonstraram capacidade para produzir a regressão de cancros em progressão tanto nas cobaias animais como em humanos. Contudo, a diferença nos resultados foi dramática. 100% dos animais tratados foram curados na maioria dos sistemas modelo, enquanto que efeitos significativos anticancerosos só foram observados numa pequena proporção de pacientes cancerosos tratados e poucas curas foram documentadas.

[0036] Face ao atrás exposto, existe claramente a necessidade de desenvolver uma estratégia de CAI que seja efectiva, não-tóxica e exequível nos pacientes humanos cancerosos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0037] A presente invenção respeita à utilização de linfócitos efectores segundo a reivindicação 1 e a uma composição segundo a reivindicação 10.

[0038] Outros objectos e características da invenção são definidos nas reivindicações dependentes.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0039]

A FIG. 1 mostra uma série de imagens de tomografia axial computadorizada do paciente HT-98-3 que representam a regressão do cancro após a CAI. O paciente recebeu uma alta dose de quimioterapia em Março de 1998. A CAI foi administrada em 29 de Junho de 1998 e em 25 de Agosto de 1998. A seta identifica uma massa parenquimatosa.

A FIG. 2 mostra uma curva de sobrevivência para os pacientes que recebem uma CAI após serem submetidos a uma alta dose de quimioterapia e o resgate de células-mãe.

A FIG. 3 mostra uma série de imagens de ressonância magnética de um doente com astrocitoma tratado com CAI. As ressonâncias mostram o astrocitoma do paciente em 16 de Fevereiro de 1995, três meses após a cirurgia e imediatamente antes da imunoterapia (fila superior), em 15 de Maio de 1995, dois meses após a imunoterapia (fila do centro), e em 20 de Novembro de 1995, oito meses após a imunoterapia (fila inferior).

A FIG. 4 mostra uma série de imagens de ressonância magnética de outro paciente com astrocitoma tratado com CAI. As ressonâncias mostram o astrocitoma do paciente em 4 de Janeiro de 1996, imediatamente antes da cirurgia (fila superior), em 27 de Março de 1996, três meses após a cirurgia e imediatamente após o término da imunoterapia, e em 20 de Outubro de 1997, dezoito meses após a imunoterapia.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A. IMUNOTERAPIA POR ANTIGÉNIO DO CANCRO

serem suficientes para regredir os cancros, talvez fosse possível que as duas fossem sinérgicas. A base imunológica para combinar as duas estratégias é a de que é essencial induzir o sistema imunitário do paciente para que reconheça e responda aos antígenos expressos pelas células malignas. A vacinação cumpre este requisito. Assim que se tenham produzido respostas imunitárias, os linfócitos T poderiam ser removidos do indivíduo imunizado, podendo o seu número e potência ser aumentados em laboratório e podendo ser devolvidos ao paciente onde poderiam deslocar-se para locais de crescimento do cancro e rejeitar os cancros em progressão. Fazendo isto produzir-se-ia um aumento global do número de linfócitos T efectores que se introduzem no tumor.

[0027] A prova deste princípio foi estabelecida em estudos com animais nos quais os linfócitos foram removidos dos animais imunizados, estimulados com células cancerosas e pequenas quantidades (≤ 100 UI/ml) de IL-2 em cultura e adoptivamente transferidos para animais com tumores. Esta estratégia combinatória foi capaz de curar permanentemente o cancro em progressão. Vide Cheever et al., Specific Adoptive Therapy of Murine Leukemia with Cells Secondarily Sensitized *in vitro* and Expanded in IL-2, Progr. Cancer Res. Ther. 22:127-133 (1982); Chou & Shu, Cellular Interactions and the Role of Interleukin 2 in the Expression and Induction of Immunity Against a Syngeneic Murine Sarcoma, J. Immunol. 139:2103-2109 (1987); Holladay et al., Cytotoxic T lymphocytes, but not Lymphokine Activated Killer Cells, Exhibit Anti-Tumor Activity Against Established Intracerebral Gliomas, J. Neurosurg. 77:757-762 (1992). Estes estudos mostram claramente que as falhas terapêuticas associadas à vacinação isoladamente estão ligadas à

Etapa 1: Vacinação

[0040] A primeira etapa na presente invenção é a imunização dos pacientes com antigénios da sua própria malignidade. Em pacientes com uma malignidade sólida, o cancro é removido cirurgicamente para criar uma suspensão celular única de células malignas. A amostra cirúrgica é digerida enzimaticamente com enzimas produzidas pela Life Technologies, Inc. sob o nome Viacell. Em pacientes com malignidades hematológicas ou sólidas com células livres no fluido pleural, pericárdico ou do peritonal, as células malignas são obtidas a partir do sangue, da medula óssea, de uma efusão pleural ou pericárdica ou do fluido ascítico. As células malignas isoladas são irradiadas a cerca de 5 000 rads para impedir o alastramento local. As células são armazenadas congeladas até à vacinação.

[0041] Aquando da vacinação, as células malignas são combinadas com um adjuvante imunológico, preferencialmente o GM-CSF recombinante humano solúvel que é produzido pela Immunex, Inc. sob o nome Leukine. Na concretização preferencial, a vacina é administrada pela via intradérmica, subcutaneamente ou intramuscularmente em múltiplos locais (aproximadamente 3 a 4) do corpo. Cada local de injeção recebe pelo menos 5×10^6 células malignas e pelo menos 100 microgramas de GM-CSF. Uma vez que as células malignas irradiadas não são tóxicas, podem ser injectadas com segurança em número mais elevado para melhorar a resposta imunitária.

[0042] Os pacientes são então injectados com cerca de 100 microgramas/local de GM-CSF diariamente durante pelo menos três dias nos locais de vacinação originais. Outras

concentrações ou outras formulações de vacinação de GM-CSF também podem ser eficazes. Uma vez que as células malignas irradiadas não são tóxicas, pode-se realizar com segurança vacinações múltiplas para melhorar a resposta imunitária.

[0043] Numa concretização separada, a vacina compreende um antigénio expresso pela própria malignidade do paciente de modo a que seja induzida a activação primária dos linfócitos T do paciente. Por exemplo, o antigénio pode ser um extracto purificado do cancro ou um antigénio manipulado geneticamente ou um peptídeo antigénico que seja partilhado pelos cancros.

Etapas 2: Produção e Proliferação de Linfócitos T Efectores

[0044] A segunda etapa na CAI envolve a activação dos linfócitos T do sangue periférico de pacientes imunizados. A imunização local leva à produção de linfócitos T sensibilizados específicos de antigénio no tecido linfóide que drena os locais de imunização. Os linfócitos T sensibilizados são então libertados para o sangue a partir do tecido linfóide, para que possam ser transportados para os locais da exposição ao antigénio. Uma vez que os linfócitos T sensibilizados são libertados no sangue, o sangue periférico deve providenciar a fonte mais rica de precursores efectores de linfócitos T específicos de antigénio de cancro. O método preferencial para a obtenção de linfócitos do sangue periférico é através da leucaferese. A altura preferencial para realizar a leucaferese é dentro de duas semanas a seguir à segunda vacinação.

[0045] Na concretização preferencial, a activação e proliferação dos linfócitos T ocorrem durante a cultura das células *in vitro* como resultado de uma interacção coo-

perativa entre monócitos aderentes e linfócitos T não aderentes. Os glóbulos vermelhos sanguíneos ("RBCs") são removidos da amostra de leucaferese através de lise selectiva com Tris-cloreto de amónio. As células mononucleares do sangue periférico são então cultivadas em frascos plásticos de cultura de tecidos que permitem a adesão das células num meio de cultura de tecido contendo soro. Utiliza-se um soro autólogo, mas pode ser substituído por outras fontes de soro.

[0046] Na concretização preferencial, os linfócitos T do sangue periférico são estimulados em cultura com anti-CD3 monoclonal de ratos que é produzido pela Ortho Pharmaceuticals sob o nome OKT3. No entanto, outros estimulantes de linfócitos T não específicos, tais como a enterotoxina estafilocócica ou a briostatina-1 podem ser substitutos para o anti-CD3. Apesar de o estimulante não necessitar de ser capaz de se ligar ao receptor antigénico nem às proteínas associadas ao receptor antigénico, o estimulante deve ser capaz de estimular as células T sensibilizadas para que se diferenciem em linfócitos T efectores que mantêm uma especificidade de antigénio tumoral e uma actividade de efector. Na concretização preferencial, a concentração óptima de anti-CD3 para estimular a diferenciação de linfócitos T sensibilizados para o antigénio em linfócitos T efectores situa-se entre 0,01 e 100,0 nanogramas/mililitro. Na concretização preferencial, os linfócitos T do sangue periférico são expostos a anti-CD3 durante cerca de 24 a 48 horas, adicionando-se então a IL-2 às culturas. A interleuquina-2 é produzido pela Chiron Pharmaceutical, Inc. sob o nome Proleukin.

[0047] Na concretização preferencial, as células efectoras estimuladas são proliferadas em cultura utilizando a

IL-2. Outras citocinas capazes de estimular a proliferação de linfócitos T, tais como a IL-15, podem ser substitutas para a IL-2. Na concretização preferencial, a concentração óptima de IL-2 para estimular a proliferação de linfócitos T activados situa-se entre 10 e 100 UI/mililitro.

Etapa 3: Infusão de Linfócitos T Activados

[0048] Após as células estimuladas serem recolhidas da cultura, as células são injectadas por via intravenosa. Apesar de o paciente geralmente ser injectado com cerca de 10^{10} a 10^{12} de linfócitos durante um período de cerca de 1 a 6 horas, o número de células mononucleares administrado está apenas dependente do número de células criadas durante a etapa de proliferação. Foram injectados, com segurança, mais de 10^{12} de linfócitos autólogos em pacientes cancerosos.

[0049] A presente invenção será seguidamente explicada mais especificamente pelos seguintes exemplos. No entanto, o âmbito da presente invenção não se limita aos exemplos.

B. EXEMPLO DE CANCRO DA MAMA

Etapa 1: Vacinação

[0050] Neste exemplo, todos os pacientes elegíveis tinham um carcinoma da mama de estadio IV confirmado e histopatologicamente operável e tinham falhado na quimioterapia normal para o cancro da mama de estadio IV (metastático).

[0051] Foram obtidas em condições de esterilidade amos-

tras tumorais frescas aquando da ressecção cirúrgica. Tal como mostrado no Quadro 1, as amostras foram obtidas de vários locais do corpo. As amostras foram transportadas para o laboratório em solução salina isotónica à temperatura ambiente. O tecido foi processado em condições de esterilidade. As suspensões de células únicas foram preparadas agitando fragmentos de tecido durante cerca de 2 a 3 horas a aproximadamente 37°C numa mistura enzimática num frasco de tripsinização. Contaram-se as células e determinou-se a viabilidade por exclusão de azul de tripano. Uma parte das células foi cultivada num meio de cultura de tecidos suplementado com cerca de 20% de soro bovino fetal para desenvolver linhas celulares das células malignas dos pacientes e para testar a esterilidade. As células restantes foram irradiadas a aproximadamente 5 000 rads e armazenadas congeladas a cerca de -70°C num meio de cultura de tecido suplementado com antibióticos, cerca de 10% de dimetilsulfóxido e cerca de 20% de soro humano.

[0052] Imediatamente antes de se vacinar os pacientes, as células congeladas foram descongeladas e suspensas num meio de cultura de tecidos suplementado com cerca de 20% de soro humano AB⁺. Aproximadamente 10⁷ de células da amostra de cancro original foram sedimentadas e depois misturadas com 1,0 ml de GM-CSF (500 microgramas).

Quadro 1. Características do tumor

Paciente n.º	Local	n.º de Células tumorais ¹	% Viabilidade	Esterilidade ²	Linha celular ³
HT-95-23	Parede abdominal	2x10 ⁷	90	+	+
HT-95-50	Ascites	3x10 ⁸	99	+	+
HT-95-57	Gânglio linfático	3,2x10 ⁶	80	+	+
HT-95-12	Pulmão	1,5x10 ⁸	75	+	+
HT-95-56	Mama	<10 ⁵	85	+	+
HT-96-62	Mama	2,7x10 ⁷	93	+	+
HT-96-4	Mama	7,1x10 ⁷	89	+	+
HT-96-32	Mama	6,2x10 ⁶	95	+	+
HT-96-47	Pulmão	4,0x10 ⁸	70	+	+

HT-97-3	Pulmão	$1,0 \times 10^8$	99	+	+
HT-97-4	Parede do tórax	$4,0 \times 10^7$	99	+	+
HT-97-6	Gânglio linfático	$4,3 \times 10^7$	93	+	+
HT-98-1	Pulmão	$6,8 \times 10^7$	94	-	-
HT-98-3	Parede do peito	$3,0 \times 10^7$	95	+	+
HT-98-15	Pulmão	$6,1 \times 10^8$	95	+	-
HT-98-18	Parede do peito	$7,3 \times 10^7$	90	-	+
HT-98-73	Fígado	2×10^7	75	+	+
HT-99-2	Mama	3×10^7	80	-	+
HT-99-35	Gânglio linfático	1×10^7	95	-	+

¹ Número de células obtidas a partir da amostra cirúrgica. Obtiveram-se células adicionais para a vacinação e teste cutâneo através do desenvolvimento de células em cultura.

² (+) - Inexistência de crescimento microbiano.

³ (+) - As células tumorais desenvolveram-se a partir da amostra cirúrgica.

[0053] As células tumorais foram injectadas em três ou quatro locais intradérmicos, bilateralmente na parte superior dianteira da coxa e bilateralmente na parte superior dianteira do tórax. Os pacientes que tinham tido mastectomias totais com remoção unilateral de LNs drenantes foram injectados em apenas três locais. O volume da injeção foi de aproximadamente 0,25 ml/local. Os locais de injeção iniciais foram marcados, e cada local foi novamente injectado com cerca de 100 microgramas de GM-CSF diariamente durante 4 dias adicionais. Uma segunda vacinação contendo 10^7 de células tumorais e uma quantidade similar de GM-CSF foi identicamente administrada na mesma área geral duas semanas mais tarde.

[0054] Fez-se um teste cutâneo aos pacientes para avaliar o desenvolvimento de uma resposta de DTH específica de um antígeno cancerígeno autólogo aquando da segunda vacinação. A teoria subjacente ao teste cutâneo de DTH é a de que ocorre uma reacção de DTH porque os linfócitos T sensibilizados específicos de um antígeno do cancro deixam o sangue periférico, entram na pele e interagem com o antígeno do cancro e com as células que apresentam o antígeno, para produzir uma resposta imunitária local. A intensidade da resposta é directamente proporcional ao diâmetro do eritema e ao endurecimento que ocorre locali-

zadamente no local da injeção e ao número de linfócitos T específicos de antígeno que entram no local. Por outras palavras, a intensidade da resposta é directamente proporcional à imunidade que o indivíduo possui face ao antígeno que foi utilizado no teste cutâneo. Por conseguinte, o teste cutâneo fornece um teste simples e fiável *in vivo* relativo à imunidade ao cancro que exige números relativamente pequenos de células cancerosas. A resposta de DHT fornece uma medida bem estabelecida da imunidade mediada por células que foi extensivamente estudada em cobaias animais e em humanos. Mostrou-se que a intensidade da resposta se correlaciona directamente com a imunidade protectora em incontáveis sistemas de modelos experimentais e naturais. Também se mostrou que a intensidade da resposta se correlaciona directamente com resultados de vários testes da função imunitária *in vitro*.

[0055] O teste cutâneo foi realizado injectando-se cerca de 10^7 de células cancerosas intradermicamente na parte dianteira do antebraço esquerdo. Quando disponíveis, foram utilizadas no teste cutâneo as células cancerosas cultivadas. As células cancerosas cultivadas estavam isentas de enzima digestiva e de proteínas do soro humano porque as células haviam sido cultivadas através de várias passagens em meio contendo soro bovino fetal. Do mesmo modo, acredita-se que múltiplas passagens em cultura eliminam células estromais contaminantes que não se replicam tão rapidamente como as células malignas. As reacções contra o GM-CSF ou contaminantes associados ao GM-CSF foram excluídas porque o GM-CSF também não foi incluído no reagente do teste cutâneo. Por conseguinte, as células cancerosas autólogas foram as únicas substâncias potencialmente antigénicas partilhadas pela vacina original e pelo reagente do teste

cutâneo. Quando o número de células cultivadas era insuficiente para o teste cutâneo, os testes cutâneos dos pacientes foram feitos com células da amostra tumoral original, ou utilizou-se o local da vacinação como um indicador de resposta imunitária. As reacções de DHT foram medidas em todos os locais de teste cutâneo cerca de 24 e 48 horas após a injeção. Definiu-se uma resposta positiva como uma reacção de pápula e ruborização com um diâmetro superior ou igual a 4 mm. Para determinar se o GM-CSF por si só estimulava reacções locais, injectou-se 100 microgramas de GM-CSF por via intradérmica na parte dianteira do antebraço direito, e os locais foram avaliados de modo semelhante.

Etapas 2: Produção e Proliferação de Linfócitos T Efectores

[0056] Duas semanas após a segunda imunização, foram isolados glóbulos brancos sanguíneos mononucleares ("WBCs") do sangue periférico não mobilizado através de um cateter Quinton na veia subclavicular, utilizando um separador de células. O número total de leucócitos obtido da leucaferese individual variou entre cerca de 5×10^9 e 3×10^{10} . Os pacientes foram submetidos a leucaferese duas ou três vezes nos dias seguintes a cada tratamento. Foram obtidas contagens diferenciais em todas as amostras. Os linfócitos contribuíram com cerca de 40-90% do total das células. Os RBCs foram removidos de todas as amostras através de lise selectiva com tris-cloreto de amónio antes da cultura. Os WBCs foram suspensos num meio de cultura de tecidos suplementado com antibióticos e soro autólogo (meio de cultura). Adicionou-se anti-CD3 ("OKT3") à mistura celular e as células foram colocadas em frascos de cul-

tura de tecidos. As células foram incubadas a aproximadamente 37°C durante cerca de 48 horas. Posteriormente, adicionou-se IL-2 (100 UI/ml) às células estimuladas com anti-CD3. De seguida, as células foram cultivadas durante três a cinco dias e, após atingirem a máxima densidade, foram colhidas nos sacos de infusão IV. Determinou-se a contagem e a viabilidade. A análise morfológica foi realizada pela contagem diferencial de células tingidas citocentrifugadas. As células recolhidas foram testadas com respeito à contaminação fúngica, microbiana e por endotoxinas.

Etapas 3: Infusão de Linfócitos T Activados

[0057] Os pacientes receberam Compazine® (10 mg por injeção IV directa), Benadryl® (25-50 mg por injeção IV directa) and Tylenol® (650 mg PO) antes da infusão de células. Células estéreis isentas de endotoxinas foram infundidas nos pacientes através de uma veia periférica durante um período de 1-3 horas numa instalação de infusão IV externa ao paciente. Os números de células introduzidas são detalhados no Quadro 3. Se os pacientes sentissem arrepios, recebiam Demerol® (25 mg por injeção IV directa) que se repetia consoante a necessidade. Os pacientes eram monitorizados quanto à toxicidade durante três horas após o término da infusão celular.

[0058] Os pacientes também receberam IL-2 por *bolus* por infusão IV uma vez por dia. Os pacientes receberam cerca de 3×10^6 UI de IL-2 por dia em dias alternados durante 10 dias (5 tratamentos). Esta quantidade de IL-2, que é geralmente vista como sendo uma baixa dosagem, não foi associada a quaisquer efeitos clínicos quando utilizada por si

só em cobaias animais ou em humanos.

Resultados: Vacinação

[0059] Tal como acima discutido, a resposta de DTH foi directamente dirigida contra os antígenos associados às células do cancro da mama. Os resultados de DTH dos pacientes com cancro da mama são detalhados no Quadro 2. Com uma excepção, as reacções de DTH não se conseguiram desenvolver nos locais de imunização primária, demonstrando que a vacina não estimulou de modo não específico as respostas inflamatórias locais. Foram detectadas respostas positivas de DTH após a vacinação primária em 14 de 15 pacientes. As características físicas e a cinética das respostas foram típicas de reacções de DTH clássicas.

Quadro 2. Resultados da vacinação

Paciente n.º	Número de células	Adjuvante	DTH no 1.º local	DTH no 2.º local	Teste cutâneo	GM-CSF
HT-95-56	5 x 10 ⁶	GM-CSF	negativo	positivo	ND	negativo
HT-95-62	1 x 10 ⁷	GM-CSF	negativo	positivo	ND	negativo
HT-96-4	2 x 10 ⁷	GM-CSF	negativo	negativo	ND	negativo
HT-96-32	1 x 10 ⁷	GM-CSF	negativo	positivo	ND	negativo
HT-96-47	1 x 10 ⁷	GM-CSF	negativo	positivo	ND	negativo
HT-97-3	2 x 10 ⁷	GM-CSF	>40 mm	positivo	35 mm	negativo
HT-97-4	2 x 10 ⁷	GM-CSF	negativo	positivo	30 mm	negativo
HT-97-6	2 x 10 ⁷	GM-CSF	negativo	positivo	12 mm	negativo
HT-98-1	2 x 10 ⁷	GM-CSF	negativo	negativo	50 mm	negativo
HT-98-3	2 x 10 ⁷	GM-CSF	negativo	positivo	>30mm	negativo
HT-98-15	2 x 10 ⁷	GM-CSF	negativo	negativo	20 mm	negativo
HT-98-18	2 x 10 ⁷	GM-CSF	negativo	positivo	ND	negativo
HT-98-73	1 x 10 ⁷	GM-CSF	negativo	positivo	14 mm	negativo
HT-99-2	2 x 10 ⁷	GM-CSF	negativo	positivo	28 mm	negativo
HT-99-35	1 x 10 ⁷	GM-CSF	negativo	positivo	4 mm	negativo

NA - não aplicável; ND - não executado

[0060] Os resultados mostraram claramente pela primeira vez que as células do cancro da mama são imunogénicas no hospedeiro original e que a maioria, se não todos os doentes com cancro de mama, têm cancros imunogénicos. Isto significa que o cancro da mama é potencialmente susceptível

à imunoterapia. O estudo também demonstrou que a presença de malignidade avançada da mama não impede a criação de respostas imunitárias específicas ao antígeno do cancro autólogo. Os pacientes não desenvolveram tolerância relativamente aos seus próprios cancros. É improvável que a imunossupressão sistémica específica ou não específica seja a explicação para o facto de os pacientes cancerosos não conseguirem desenvolver imunidade contra as suas próprias malignidades em progressão. Os resultados também demonstraram que várias formas de quimioterapia padrão e experimental, incluindo a quimioterapia de alta dosagem seguida de reconstituição de células-mãe, que são classicamente utilizadas para tratar o cancro da mama, não evitam permanentemente que se gerem *in vivo* respostas imunitárias específicas ao antígeno do cancro.

Resultados: Características do Crescimento de Células Estimuladas com OKT-3

[0061] Tal como acima discutido, a vacinação com células cancerosas autólogas sensibiliza os linfócitos T e induz respostas que protegem os animais vacinados de desenvolverem tumores. A transferência adoptiva de linfócitos T efectores específicos de um antígeno do cancro produz a rejeição de malignidades em progressão. A estimulação de linfócitos T de animais imunizados com anti-CD3 converte as populações de linfócitos com elevado número de linfócitos T sensibilizados específicos de um antígeno do cancro em populações de linfócitos com elevado número de linfócitos T efectores específicos de um antígeno do cancro. Consequentemente, o anti-CD3 é um dos métodos mais eficazes de activação de linfócitos T para o tratamento de

tumores e tem a vantagem de ser rapidamente aplicável no desenvolvimento de estratégias semelhantes em humanos. Apesar de o anti-CD3 ser um estimulante de linfócito T não específico, os efeitos anticancerosos in vivo dos linfócitos T efectores são específicos de antígeno do cancro. Consequentemente, um segundo fim do presente exemplo foi determinar se os linfócitos T activados poderiam ser rotineiramente produzidos a partir do sangue periférico de pacientes com cancro da mama imunizados utilizando uma estratégia de estimulação com anti-CD3/IL-2. [0062] Como se vê no Quadro 3, as células de todos os pacientes exibiram um crescimento vigoroso em resposta ao OKT3 e à IL-2. Podem ser feitas várias observações gerais acerca dos padrões de crescimento que se desenvolveram à medida que as culturas progrediram. Os monócitos ligaram-se à superfície de algumas células aderentes, formando agregados de monócitos/linfócitos. Os linfócitos que se ligaram às células aderentes também passaram por alterações morfológicas. Principalmente evidenciadas pelo aumento de tamanho. Pelo contrário, as culturas que não continham OKT3 (controle de IL-2) não exibiram qualquer ligação dos linfócitos às células aderentes nem alterações morfológicas. Os linfócitos permaneceram pequenos e redondos e livres na solução. Apesar de o número de linfócitos ligados aumentar com o tempo, e de a proporção das células aderentes com linfócitos ligados também ter aumentado com o tempo, não houve sinais de proliferação de células durante a fase com o OKT3. Não houve aumento do número de células quando se realizaram contagens de células em culturas às quais não se adicionou IL-2 (controle OKT3).

Quadro 3. Desenvolvimento das Células Mononucleares dos

Pacientes a Seguir à Estimulação com Anti-CD3/IL-2

Paciente n.º	Número inicial de células	Diferencial inicial ¹	Número de células no produto final	% de linfócitos Morf / CD 3	CD4/CD 8
HT-95-23	$2,5 \times 10^{10}$	75/18/7	$1,6 \times 10^{10}$	92/88	0,62
HT-95-50	$1,9 \times 10^{10}$	57/27/16	$1,6 \times 10^{10}$	92/86	4,4
HT-95-55	$3,6 \times 10^{10}$	51/11/38	$4,7 \times 10^{10}$	94/98	2,3
HT-95-12	$2,2 \times 10^{10}$	66/17/17	$5,0 \times 10^{10}$	96/ND	ND ²
HT-95-62	$2,5 \times 10^{10}$	70/19/11	$7,0 \times 10^{10}$	99/95	2,5
HT-95-56	$1,7 \times 10^{10}$	75/21/4	$4,3 \times 10^{10}$	98/95	2,1
HT-96-4	ND				
HT-96-32	$3,0 \times 10^{10}$	73/17/10	$5,6 \times 10^{10}$	99/ND	ND
HT-96-47	$2,1 \times 10^{10}$	60/30/10	$5,4 \times 10^{10}$	96/92	1,0
HT-97-3	$4,6 \times 10^{10}$	83/14/2	$8,3 \times 10^{10}$	96/ND	ND
HT-97-4	$3,3 \times 10^{10}$	69/28/3	$9,3 \times 10^{10}$	97/ND	ND
HT-97-6	$3,1 \times 10^{10}$	44/37/19	$4,5 \times 10^{10}$	85/ND	ND
HT-98-1	$2,7 \times 10^{10}$	83/13/1	$8,3 \times 10^{10}$	90/10	1,5
HT-98-3	$3,0 \times 10^{10}$ $4,4 \times 10^{10}$	89/8/3 84/15/1	$3,8 \times 10^{10}$ $1,4 \times 10^{11}$	93/ND 91/96	ND 3,9
HT-98-15	$2,5 \times 10^{10}$ 4,3 x 10^{10}	70/15/10 86/10/4	$5,4 \times 10^{10}$ 1,1 x 10^{11}	97/90 89/95	0,4 1,4
HT-98-73	$2,6 \times 10^{10}$	75/16/8	8×10^{10}	95/90	2,3
HT-99-2	$2,6 \times 10^{10}$	S5/25/18	$1,0 \times 10^{11}$	85/93	3,5
HT-99-11	$2,6 \times 10^{10}$	72/28/6	$6,0 \times 10^{10}$	93/93	1,7
HT-98-18	$3,3 \times 10^{10}$ 3,0 x 10^{10}	64/14/22 66/28/6	$2,2 \times 10^{10}$ 1,1 x 10^{11}	99/ND 88/94	ND 0,7

¹ Linfócitos/monócitos/granulócitos obtidos a partir de pacientes com cancro da mama não imunizados
² ND - não executado

[0063] Ocorreram várias alterações dignas de nota após a adição de IL-2. Houve um aumento impressionante do tamanho dos linfócitos nos complexos de células aderentes. Os números de células nos complexos aumentaram, e, como o crescimento das células prosseguiu nos complexos, os complexos desprenderam-se gradualmente da superfície do frasco. A cultura acabou por compreender complexos de células flutuantes e linfócitos livres. O exame morfológico das células nos complexos flutuantes revelou numerosas células mitóticas. À medida que os linfócitos proliferavam, os complexos tornaram-se progressivamente mais pequenos até que, na maioria dos pacientes, a população final administrada ficar monodispersa com pouquíssimos complexos de linfócitos evidentes. Quase todos os monócitos presentes

nas culturas originais acabaram por ser incluídos nos complexos, mas quando as culturas terminaram, restavam muito poucos monócitos/macrófagos. Como se mostra no Quadro 3, as culturas colhidas eram quase invariavelmente compreendidas principalmente por linfócitos T. O número de linfócitos B (células CD20+) que permaneceram nas culturas era negligenciável (dados não mostrados). O número de células que expressava NK ou marcadores NK activados era negligenciável.

[0064] Os controlos de crescimento foram realizados para controlar a proliferação e a diferenciação estimulada por OKT3 e IL-2. As células mononucleares cultivadas na ausência de OKT3 e com até 100 UI/ml de IL-2 permaneceram viáveis, mas exibiram sinais de diferenciação ou de proliferação. As células mononucleares cultivadas com OKT3 mas que nunca receberam a IL-2 durante o período de cultura exibiram alterações morfológicas estimuladas por OKT3, mas não conseguiram uma proliferação com qualquer grau significativo. As células cultivadas durante 48 horas sem OKT3 e depois estimuladas com IL-2 não exibiram a formação de complexo, alterações morfológicas nem sinais de proliferação.

[0065] Os linfócitos T que foram recolhidos no final do período de cultura expressaram invariavelmente elevados níveis de marcadores de activação de linfócitos T, incluindo CD25, CD69 e HLADr, como representado no Quadro 4. Os linfócitos T circulatórios não estimulados normalmente não exprimem níveis significativos desses marcadores, mas as populações iniciais não estavam completamente negativas, uma vez que linfócitos não-T positivos ao CD69 e HLADr também estavam presentes.

Quadro 4. Alterações de Fenótipo nas Células Mononucleares

Induzidas por Anti-CD3/IL-2

Fonte	Fenótipo Celular						
	CD3 ⁺	CD4	CD8	CD56	CD25	CD69	HLADr
HT-98-3	63/96	35/74	18/19	< ¼	3/81	19/46	12/74
HT-98-15	74/90	39/27	23/69	< 1/7	< 1/56	35/52	44/54
HT-98-18	66/94	41/41	14/55	< ¼	< 1/82	12/50	19/70
Os dados são expressos como percentagem de células positivas antes e após a cultura.							

[0066] Existiram várias razões para escolher o sangue periférico como fonte de linfócitos T. Primeiro, é facilmente acessível e renovável. Ademais, o entendimento corrente de como se desenvolvem as respostas imunitárias a seguir à vacinação é a de que a injeção local do antígeno conduz à produção de linfócitos T sensibilizados específicos de antígeno nos LNs que drenam os locais de imunização. Os linfócitos T sensibilizados são então libertados dos LNs para a circulação para que possam ser levados para locais de exposição ao antígeno. Isto deve ter ocorrido durante o presente estudo, como se comprova pelo facto de ocorrerem reacções de DTH nos locais de teste cutâneo. Alguns dos linfócitos T circulatórios sensibilizados específicos de antígeno do cancro deixaram o sangue periférico, entraram na pele e interagiram com o antígeno do cancro e com as células que apresentavam o antígeno, para produzirem uma resposta imunitária local. Portanto, o sangue periférico dos pacientes vacinados contém linfócitos T sensibilizados específicos de antígeno do cancro que podem ser convertidos em células efectoras através da estimulação com anti-CD3/IL-2. Teoricamente, uma vez que todos os linfócitos T sensibilizados para o antígeno devem ser libertados na circulação pelo tecido linfóide, o sangue periférico deve ser a melhor fonte para os precursores de efectores.

[0067] Em suma, este exemplo demonstrou que a combinação de OKT3 e IL-2 produz expansão selectiva do compartimento dos linfócitos T do sangue periférico nos pacientes com cancro de mama imunizados com as suas próprias células cancerosas. Pode deduzir-se, por estudos semelhantes em animais, que o número de células efectoras específicas de antígeno do cancro nas populações finais era directamente proporcional ao número de linfócitos T sensibilizados específicos do cancro que estavam presentes à partida.

Resultados: Toxicidade

[0068] Os testes clínicos de fase I têm o objectivo adicional de permitir a determinação da toxicidade relativa. A vacinação utilizando o GM-CSF como adjuvante apenas produziu um grau de toxicidade I/II transitório. Uma febre transitória foi o efeito secundário mais comum. Reacções de pápula e ruborização transitórias foram observadas em locais de vacinação secundários. Não houve danos do tecido local. Não ocorreu crescimento local de células cancerosas irradiadas. Pode concluir-se que as células tumorais por si mesmas não produziram toxicidade significativa e que a dosagem eficaz de GM-CSF não produziu toxicidade significativa. Os números de células detalhados no Quadro 3 foram infundidos sem toxicidade associada significativa. Houve apenas toxicidade de grau I/II transitória, sendo a febre o efeito secundário mais comum. A infusão de IL-2 teve efeitos semelhantes. Em suma, a CAI foi realizada neste grupo de pacientes com cancro da mama sem toxicidade significativa.

Resultados: Eficácia

[0069] Podem indicar-se dois pontos gerais acerca das respostas clínicas observadas durante o presente estudo da CAI em pacientes com cancro da mama. Primeiro, a CAI produziu respostas objectivas nos pacientes com cancro da mama tratados. Como exemplo, a FIG. 1 demonstra o desaparecimento de um nódulo pulmonar metastático no paciente HT-98-3 tratado. HT-98-3 tinha uma doença progressiva na parede torácica assim como uma doença parenquimatosa pulmonar. A massa da parede torácica, localizada num espaço intercostal, foi excisada por um cirurgião cardiororácico. O diagnóstico de cancro da mama foi confirmado e o tecido foi enviado para o laboratório de imunoterapia para a preparação da vacina. O paciente foi submetido então a uma terapia de alta dosagem e salvamento de células-mãe. À 6.^a e à 12.^a semanas após o transplante o paciente ainda tinha sinais de um tumor com 1 x 1 cm. O paciente foi tratado com CAI nessa altura e a lesão desapareceu. O tratamento foi há mais de um ano e meio, e o paciente não teve qualquer recorrência da doença.

[0070] No segundo paciente, HT-98-18, foi obtida uma CR inicial, após uma alta dosagem de quimioterapia e o salvamento das células-mãe, para o cancro de mama metastático resistente à quimioterapia. O paciente apresentou então no seguimento radiológico de rotina um gânglio linfático na axila esquerda assim como alguns gânglios do mediastino. A glândula na axila foi removida e confirmou-se que o tecido continha cancro de mama, tendo então sido utilizado na CAI. A linfadenopatia mostrou involução. Após vários meses, algumas das glândulas do mediastino voltaram a ficar proeminentes. Efectuou-se uma biópsia para se obter mais tecido para a imunoterapia. No entanto, nenhuma das

glândulas mostrava conter tecido maligno. Consequentemente, o paciente continua nesta altura com uma CR cirúrgica.

[0071] Um terceiro paciente, HT-99-2, que tinha múltiplas metástases no fígado, foi tratado recentemente. A completa regressão dos nódulos do fígado foi documentada por uma tomografia computadorizada. Nesta altura, é muito cedo para se saber se esta CR se correlacionará com uma maior sobrevivência.

[0072] Segundo, a este respeito, é importante salientar que todos os pacientes com cancro da mama incluídos neste exemplo tinham cancro avançado resistente à quimioterapia e que a maioria não tinha tido sucesso na quimioterapia de alta dosagem e reconstituição de células-mãe. A taxa de sobrevivência aos dois anos, para este tipo de pacientes, é muito baixa. No entanto, um elevado número de pacientes tratados continua vivo actualmente. A maioria destes pacientes não recebeu mais nenhum tratamento a seguir à imunoterapia. Os resultados de sobrevivência actuais estão sumariados na figura 2.

[0073] Em resumo, os resultados dos testes clínicos de fase I estabeleceram que o cancro de mama é imunogénico e que podem ser criadas fortes respostas imunitárias pelos doentes imunizados com células de cancro da mama e GM-CSF. Podem ser produzidos elevados números de linfócitos T activados a partir do sangue periférico dos pacientes com cancro da mama avançado. A transferência adoptiva destes linfócitos T activados para os pacientes pode ser conseguida com segurança e produzirá respostas clínicas objectivas. Os riscos da predição do impacto terapêutico de uma modalidade de tratamento a partir dos dados da fase I são bem conhecidos.

C. EXEMPLO DE ASTROCITOMA

Etapa 1: Vacinação

[0074] Neste exemplo, nove pacientes elegíveis tinham todos astrocitoma de grau III ou IV recorrente, operável, tendo uma pontuação Kamovsky ≥ 60 e tendo reduzido os esteróides. Todos os pacientes tinham previamente sido sujeitos sem sucesso a uma ressecção seguida de radioterapia convencional (55-60 Gy) e de quimioterapia. Os tumores recorrentes foram alvo de uma ressecção e confirmou-se o diagnóstico histopatológico no tumor recorrente. Todos os pacientes tinham provas radiológicas de cancro em progressão extensivo e estavam a ser tratados com esteróides para controlar o inchaço do cérebro quando os seus tumores recorrentes foram alvo de citorredução para a imunoterapia.

[0075] O tecido cancerígeno foi retalhado com tesouras e suspenso num meio contendo uma mistura enzimática produzida pela Life Technologies. A digestão completa foi atingida em 1,5 a 2,0 horas a cerca de 37°C num frasco de tripsinização. As células foram suspensas num meio suplementado com 20% de soro humano AB+ e foram contadas. As células foram irradiadas a cerca de 5000 rads e armazenadas congeladas a cerca de -70°C. Todas as preparações celulares foram viáveis em mais de 80% e estéreis.

[0076] Na altura da vacinação, foram misturadas cerca de 10^7 células cancerosas num único frasco de BCG contendo aproximadamente 10^8 de bacilos viáveis. A mistura foi injectada em quatro locais intradérmicos (0,25 ml/local), um em cada uma das axilas direita e esquerda e em cada uma das virilhas direita e esquerda, escolhidos para uma drenagem linfóide máxima. Todos os pacientes foram imunizados

pelos menos duas vezes com duas semanas de intervalo.

Etapas 2: Produção e Proliferação de Linfócitos T Efectores

[0077] Duas semanas após a segunda imunização, foram isolados WBCs mononucleares a partir do sangue periférico através de leucaferese. Os rendimentos variaram entre 5×10^9 e 2×10^{10} de células por leucaferese. Os pacientes foram sujeitos a leucaferese três vezes em dias sucessivos para cada tratamento. Os linfócitos contribuíram entre 30-80% para o total das células. Os WBCs foram suspensos num meio de cultura de tecidos suplementado com soro autólogo. Adicionou-se OKT3 à mistura celular, e as células foram colocadas em frascos de cultura de tecidos. As células foram incubadas a cerca de 37°C durante cerca de 48 horas. Quarenta e oito horas mais tarde a mistura celular foi suspensa num meio de cultura contendo IL-2. Após atingir a densidade máxima, as células foram agrupadas e recolhidas para sacos de infusão IV. Determinou-se a contagem e a viabilidade. A análise morfológica foi realizada por contagem diferencial de células tingidas, citocentrifugadas. As células foram imunofenotipadas por análise por meio de um selector de células activado por fluorescência com anticorpos para CD3, CD4, CD8, CD25, CD71 e HLADr. As células recolhidas também foram testadas com respeito à contaminação fúngica, microbiana e por endotoxinas.

Etapas 3: Infusão de Linfócitos T Activados

[0078] Foram infundidos nos nove pacientes linfócitos estéreis livres de endotoxinas. As células activadas foram infundidas na corrente sanguínea durante um período de

seis horas enquanto os pacientes estiveram no hospital. Os pacientes permaneceram na unidade de cuidados intensivos do hospital, para observação, durante pelo menos 48 horas após receberem as células. Os pacientes foram monitorizados neurologicamente e por seguimento laboratorial completo de quatro em quatro horas durante as primeiras 48 horas. Os pacientes foram monitorizados com respeito à toxicidade utilizando os Critérios de Toxicidade Comum NCI.

Resultados: Astrocitoma

[0079] Nenhum paciente experimentou mais do que 1+ de toxicidade, o que é uma toxicidade ligeira e transitória. A maioria dos pacientes experimentou febre transitória, arrepios e/ou náuseas durante e imediatamente a seguir à administração intravenosa das células cultivadas. A taxa de resposta, a sobrevivência livre da doença e a sobrevivência global foram utilizadas para medir a resposta ao tratamento. O crescimento do tumor foi monitorizado utilizando imagens de ressonância magnética (MRI). Os pacientes fizeram as MRI antes do tratamento, um mês após o tratamento e cada três meses depois deste.

[0080] As respostas clínicas estão detalhadas na figura 3, na figura 4 e no Quadro 5. O paciente n.º 1 foi tratado três meses após a cirurgia a um tumor recorrente numa altura em que o crescimento em progressão do tumor foi documentado tanto clinicamente como nas MRIs. Como se observa na figura 3, o cancro do paciente n.º 1 diminuiu progressivamente de tamanho a seguir a dois tratamentos de imunoterapia, até ao ponto de o cancro ser pouco ou nada detectável nas mais recentes MRIs. O paciente encontra-se presentemente vivo e bem, embora as dificuldades de dis-

[0081] Estes resultados mostram que a CAI é clinicamente eficaz contra o cancro cerebral. Os linfócitos transferidos adoptivamente produziram regressões objectivas em três dos 9 pacientes tratados, e a regressão foi correlacionada com o estado clínico melhorado em dois desses pacientes. Quando se iniciou a ressecção cirúrgica e a imunoterapia, todos os pacientes deste estudo tinham astrocitomas de grau III/IV em rápida progressão que requeriam esteróides para controlar o inchaço cerebral. Historicamente, estes cancros progridem invariavelmente e os doentes morrem dentro de alguns meses. A ressecção cirúrgica por si só não prolonga drasticamente a sobrevivência do paciente. Nenhum dos pacientes necessitou ou recebeu tratamento adicional. O facto de dois dos pacientes ainda continuarem vivos sem recrescimento do tumor após mais de três anos é uma descoberta nova que apenas pode ser atribuída à CAI.

D. EXEMPLO DE CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS

[0082] Uma diferença chave entre a aplicação da CAI em cancros experimentais e humanos foi a temporização, e a diferença no resultado pode estar directamente relacionada com essas diferenças. Nas cobaias animais, os indivíduos tratados tinham pequenos cancros homogéneos que eram criados alguns dias antes injectando-se células cancerosas. Em contraste, apenas com raras excepções, os pacientes cancerosos que foram tratados com a CAI nos estudos da fase I, todos tinham um cancro de estadio IV disseminado que tinha resistido a várias estratégias de tratamento não imunológico. A CAI não tinha efeito aparente na progressão da doença quando foi utilizada para tratar cobaias animais com

a doença avançada. Por conseguinte, será descrito um único caso para ilustrar o possível resultado da CAI se a CAI for administrada mais cedo na progressão da doença, quando os pacientes apenas têm doença micrometastásica.

[0083] Foi diagnosticado um cancro de rim a um homem 34 anos de idade. Realizou-se uma laparotomia exploratória e verificou-se que o rim esquerdo do paciente continha uma massa grande que se provou mais tarde ser um carcinoma de células renais. O rim foi removido e o cancro foi sujeito a uma análise patológica. O cancro pesava cerca de 2,2 quilogramas (5 lbs.), tinha invadido vasos sanguíneos e foi diagnosticado como um carcinoma de células renais de estadio IIIb. A remoção cirúrgica do cancro é o único tratamento eficaz para o carcinoma de células renais. Os carcinomas de células renais são generalizadamente encarados como sendo resistentes a todas as formas de quimioterapia. O prognóstico para pacientes com cancro das células renais no estadio III é muito fraco. O paciente voluntariou-se para o teste clínico. O paciente foi vacinado duas vezes com as suas próprias células cancerosas e desenvolveu uma reacção de DTH positiva. Foi depois tratado com um único tratamento de CAI, no qual recebeu cerca de $4,8 \times 10^{10}$ de linfócitos T autólogos activados com anti-CD3, seguido de um tratamento de 5 dias com IL-2 a cerca de 3×10^6 UI/dia. O paciente está vivo e actualmente livre de doença, mais de quatro anos após. A probabilidade de cura cirúrgica é relativamente baixa em pacientes com esta doença avançada.

[0084] Dois outros pacientes com cancro de células renais foram tratados com a CAI, com sucesso, durante os últimos dois anos. Ambos os pacientes tinham doença de estadio IV na altura do tratamento, foram tratados duas vezes, e permanecem livres da doença há mais de ano e

meio. Apesar do tamanho da amostra ser pequeno, os dados sugerem que a CAI pode ser eficaz contra os cancros de células renais de estadio III e IV e pode, efectivamente, ser capaz de eliminar permanentemente as células cancerosas dos corpos dos pacientes.

E. SUMÁRIO

[0085] O estudo do cancro da mama demonstrou que a maioria, se não todos os cancros de mama, são imunogénicos e que podem ser criadas fortes respostas imunitárias imunizando os pacientes com células do cancro de mama e GM-CSF. A questão que se coloca imediatamente é se os resultados da vacinação são generalizados a outros tipos de malignidades. Por outras palavras, o facto de os cancros da mama serem imunogénicos significa que os cancros cerebrais, os cancros do cólon, os cancros dos ovários, as leucemias, os cancros dos pulmões, os linfomas, os cancros do rim, os cancros da próstata e outros tipos comuns de cancro são igualmente imunogénicos? A resposta teórica é de que todos os cancros passam pelos mesmos tipos gerais de alterações genéticas levando à transformação maligna e são susceptíveis a alterações genéticas adicionais durante a subsequente proliferação maligna. São essas alterações genéticas que são responsáveis pela imunogenicidade das células malignas. Por conseguinte, as outras malignidades deverão ser igualmente imunogénicas. A resposta experimental é a de que, estudos utilizando células cancerosas autólogas e BCG como vacinas estabeleceram que alguns cancros cerebrais, cancros do cólon, cancros dos ovários, melanomas e cancros celulares renais são imunogénicos. Durante o curso dos estudos do inventor utilizando a vaci-

nação com células cancerosas autólogas e GM-CSF, mais de 50 pacientes foram vacinados com uma grande variedade de outras malignidades avançadas, incluindo, astrocitoma (23), neuroblastoma (2), meduloblastoma (1), carcinoma do ovário (3), carcinoma de células renais (8), melanoma (16), carcinoma do cólon (6) e carcinoma do pulmão (3). As respostas obtidas nestes pacientes, todos com malignidade avançada, foram qualitativa e quantitativamente semelhantes às respostas acima detalhadas para os doentes com cancro da mama. Isto é, os pacientes que tinham neoplasmas imunogénicos.

[0086] Entende-se que os exemplos e concretizações aqui descritos só têm finalidade ilustrativa e que várias modificações ou alterações à luz dos mesmos que serão aparentes a peritos na técnica devem considerar-se incluídas no âmbito das reivindicações anexas.

Porto, 28 de Maio de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de linfócitos T efectores para a produção de uma composição farmacêutica para o tratamento do cancro, tendo os ditos linfócitos T efectores sido gerados por:
 - a. estimulação de linfócitos T sensibilizados para os diferenciar de linfócitos efectores *in vitro*;
e
 - b. estimulação dos linfócitos T efectores para proliferar *in vitro*;
tendo os ditos linfócitos T sensibilizados sido gerados por
 - c. vacinação de um paciente com uma vacina que contém o próprio tumor maligno do paciente e um adjuvante imunológico;
 - d. remoção dos linfócitos T sensibilizados do sangue periférico do paciente.
2. Utilização de linfócitos T efectores segundo a reivindicação 1, na qual o adjuvante imunológico é o GM-CSF.
3. Utilização de linfócitos T efectores segundo uma das reivindicações 1 ou 2, na qual a etapa de remoção se realiza por leucaferese.
4. Utilização de linfócitos T efectores segundo uma das reivindicações 1 a 3, na qual a etapa de diferenciação se realiza utilizando-se um anticorpo anti-CD3.

FIG. 1

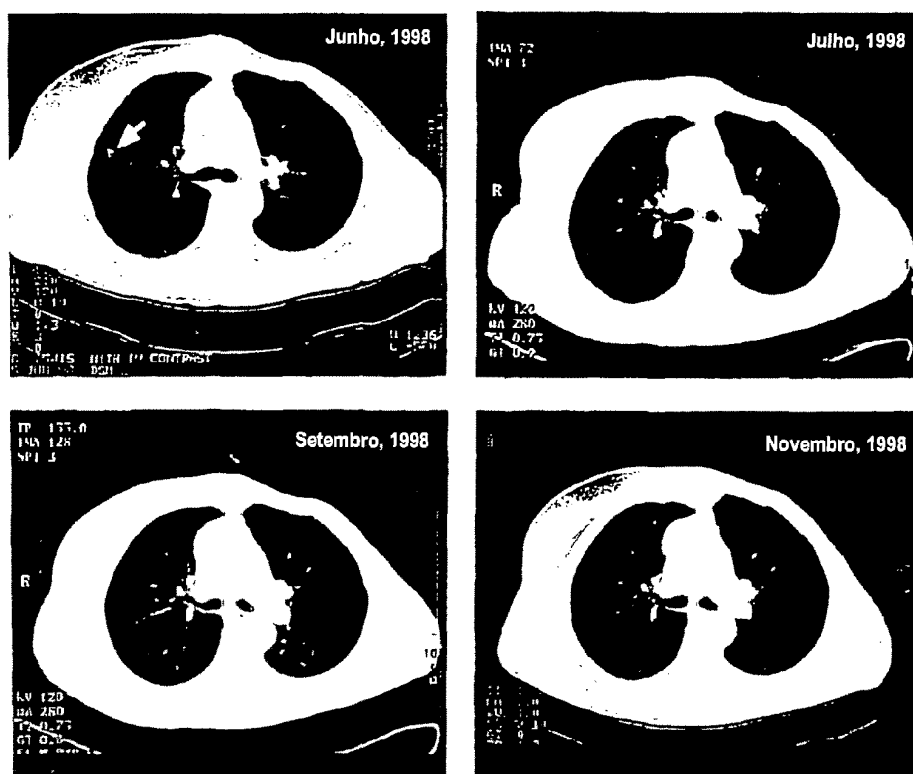


FIG. 2
Sobrevivência Global

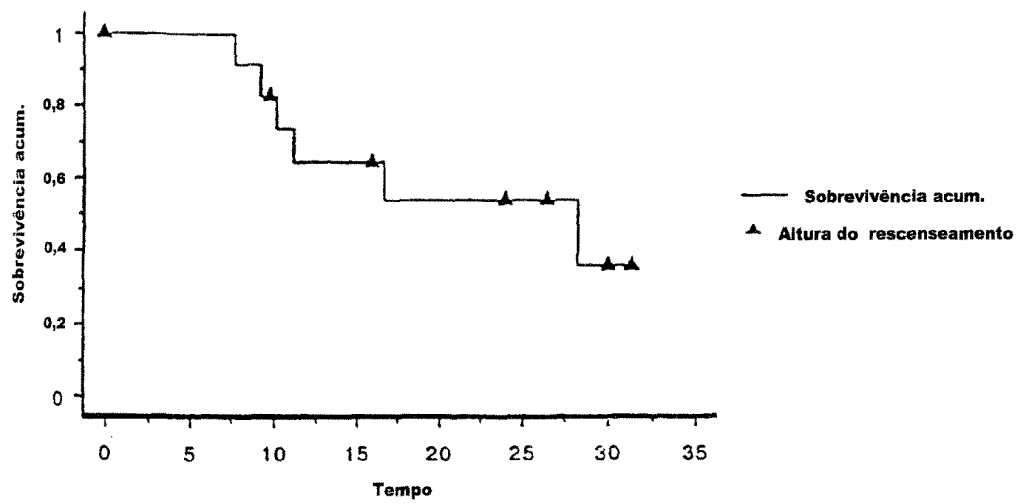


FIG. 3

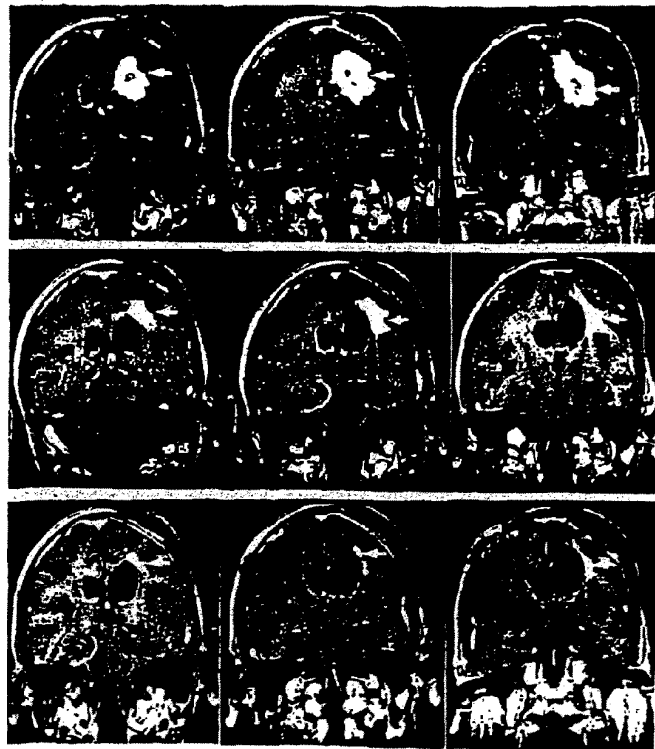


FIG. 4

